



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **07099980 A**(43) Date of publication of application: **18 . 04 . 95**

(51) Int. Cl.

**C12N 15/09****C07K 14/37****C12N 1/21****C12P 13/04**
**/(C12N 15/09 , C12R 1:01 ), (C12N  
1/21 , C12R 1:19 ), (C12P 13/04 ,  
C12R 1:19 )**
(21) Application number: **05273078**(22) Date of filing: **05 . 10 . 93**(71) Applicant: **JAPAN ENERGY CORP**
 (72) Inventor: **TEKU CHIYAN BARA  
AOSHIMA YOSHIO  
FURUHASHI KEIZO**

**(54) GENE DNA ENCODING POLYPEPTIDE HAVING  
NITRILASE ACTIVITY AND PRODUCTION OF  
CARBOXYLIC ACID FROM NITRILES BY  
TRANSFORMANT CONTAINING THE SAME**

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a new gene encoding a polypeptide having nitrilase activity derived from *Rhodococcus rhodochrous*, capable of industrially and advantageously producing a carboxylic acid from a nitrile by a genetics engineering method.

CONSTITUTION: *Rhodococcus rhodochrous* PA-34 (FERM BP-1559) is added to a medium, cultured at 30°C

for 24 hours, mixed with glycine and further cultured for 24 hours. The cell is collected, suspended in tris-hydrochloric acid buffer solution (pH 8), treated with lysozyme and peptidase and further ground to collect a gene contained in the cell. Then, the gene is treated with a restriction enzyme and bonded to a vector to prepare a DNA library by a conventional method. The DNA library is screened with a probe containing part of a gene encoding nitrilase to select a clone. A DNA is recovered from the clone and treated with a restriction enzyme to give the objective new gene encoding a polypeptide having nitrilase activity.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-99980

(43) 公開日 平成7年(1995)4月18日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A			
C 0 7 K 14/37		8318-4H		
C 1 2 N 1/21		7236-4B		
		9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
			(C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
審査請求 未請求 請求項の数7 F D (全 9 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平5-273078

(22) 出願日 平成5年(1993)10月5日

(71) 出願人 000231109

株式会社ジャパンエナジー  
東京都港区虎ノ門二丁目10番1号

(72) 発明者 テク チャン パラ

インド ヒマチャル プラデシュ シムラ  
-171005 サマーヒル サクール ニバス  
8

(72) 発明者 青島 美穂

神奈川県横浜市梅が丘17-2-212

(72) 発明者 古橋 敬三

埼玉県戸田市新曽南三丁目17番35号 株式  
会社日鉱共石内

(74) 代理人 弁理士 藤野 清也

(54) 【発明の名称】 ニトリラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子DNA、およびこれを含有する形質転換体によるニトリル類からカルボン酸の製造法

(57) 【要約】

【構成】 ニトリラーゼ活性を有する配列表配列番号1のアミノ酸配列で表されるポリペプチドをコードする遺伝子DNA。このDNAをベクターに組込んだ組換え体DNA及び形質転換体。この形質転換体を用いてニトリルからカルボン酸を製造する方法。

【効果】 上記遺伝子DNAを見出したことにより遺伝子工学的手法により、ニトリルからカルボン酸を工業的に有利に製造できる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ニトリラーゼ活性を有する配列表配列番号1のアミノ酸配列で表されるポリペプチドをコードする遺伝子DNA。

【請求項2】 ニトリラーゼをコードするDNA配列が配列表配列番号2のDNA配列である請求項1記載の遺伝子DNA。

【請求項3】 請求項1または2記載の遺伝子DNAをベクターに組み込んだ組換え体DNA。

【請求項4】 請求項3記載の組換え体DNAで形質転換された形質転換体。

【請求項5】 形質転換体がFERM BP-4404またはFERM BP-4405である請求項4記載の形質転換体。

【請求項6】 請求項4または5記載の形質転換体を培養し、生成する菌体あるいはその処理物をニトリル類に作用させ対応するカルボン酸類を製造することを特徴とするカルボン酸類の製造方法。

【請求項7】 ニトリルが $\alpha$ -アミノニトリルであり、カルボン酸が $\alpha$ -アミノ酸である請求項6記載のカルボン酸類の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ロドコッカス ロドクロス(*Rhodococcus rhodochrous*)起源の、ニトリル類に対応するカルボン酸類に変換するニトリラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子DNAに関する。また、本発明は、この遺伝子DNAをベクターに組み込んだ組換え体DNA及びこの組換え体DNAで形質転換された形質転換体に関する。さらに、本発明は、ニトリルをこの形質転換体によって対応するカルボン酸類に変換する方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】ニトリル類を水和して対応するカルボン酸類に変換する酵素はニトリラーゼとして知られており、当該酵素を産生する微生物としては、例えば、*Fusarium oxysporum* f. sp. *meionis*(*Biotechnol. Appl. Biochem.*, **11**, 581-601(1989))、*Fusarium solani*(*Biochem. J.*, **167**, 685-692(1977))、*Nocardia* sp. (*Int. J. Biochem.*, **17**, 677-683(1985))、*Arthrobacter* sp. (*Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 302-306(1986))、*Rhodococcus rhodochrous* J1(*Eur. J. Biochem.*, **182**, 349-356(1989))、*Rhodococcus rhodochrous* K22(*J. Bacteriol.*, **172**, 4807-4815(1990))、*Rhodococcus rhodochrous* PA-34(*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 184-190(1992))等を挙げることができる。これらの微生物のうち、 $\alpha$ -アミノニトリルから光学活性な $\alpha$ -アミノ酸を製造することが知られているのはロドコッカス ロドクロス(*Rhodococcus rhodochrous*)PA-34 だけである。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、遺伝子

組換え操作によりニトリラーゼ遺伝子をクローン化し、これをベクターに組み込んで組換え体DNAとし、組換え体DNAで微生物を形質転換し、微生物菌体内にニトリラーゼ遺伝子のコピーを多数存在させて、微生物の触媒活性を飛躍的に増大させてニトリル類からカルボン酸類を製造することについて鋭意検討を行った。その結果、ロドコッカス ロドクロス(*Rhodococcus rhodochrous*)に由来するニトリラーゼ遺伝子を見出し、その塩基配列を決定することができた。そして、この遺伝子DNAを用いて上記遺伝子組換え操作によりニトリル類から対応するカルボン酸を収率よく得ることができることを見出して本発明を完成するに至った。すなわち、本発明の課題は、ニトリラーゼ遺伝子を提供することにある。

【0004】また、本発明の課題は、この遺伝子を用いて遺伝子組換え操作によりニトリル類から対応するカルボン酸類を製造する方法を提供することにある。さらに、本発明の課題は、この遺伝子組換え操作で使用する組換え体DNA及び形質転換体を提供することにある。本発明の方法では、特に $\alpha$ -アミノニトリルから対応する光学活性 $\alpha$ -アミノ酸を簡単に製造できる。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記したようにロドコッカス ロドクロス(*Rhodococcus rhodochrous*)PA-34 からニトリラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子DNAを分離して塩基配列を決定し、これをベクターに組み込んで組換え体DNAとし、さらに組換え体DNAで微生物を形質転換して形質転換体を作製し、これを用いてニトリル類のカルボン酸類への変換を行うことにより、本発明を完成した。

【0006】以下、本発明を詳細に説明する。本発明のニトリラーゼ遺伝子の供給源としては、ニトリラーゼ活性を有するロドコッカス ロドクロス(*Rhodococcus rhodochrous*)PA-34 が使用される。本菌株の菌学的性質は特開平4-79894 号公報に記載されている。本菌株は微工研条寄第1559号(FERM BP-1559)として工業技術院微生物工業技術研究所(生命工学工業技術研究所)に寄託されている。本発明は下記(1)～(5)の工程により実施される。

【0007】(1) ニトリラーゼのアミノ酸配列のN-末端の部分配列の決定とDNAプローブの作製  
ロドコッカス ロドクロス(*Rhodococcus rhodochrous*)PA-34 からニトリラーゼを抽出精製し、そのN-末端のアミノ酸配列を決定する。決定したアミノ酸配列をもとに推定した遺伝子の塩基配列を持つDNAプローブを合成する。

【0008】(2) ニトリラーゼ遺伝子を含むDNA断片の調製

ロドコッカス ロドクロス(*Rhodococcus rhodochrous*)PA-34 から染色体DNAを分離し、制限酵素で切断後、サザンハイブリダイゼーションによりニトリラーゼ遺伝

子を含むDNA断片を工程(1)で調製したDNAプローブで検出する。

【0009】(3)組換え体DNAライブラリーの作製工程(2)で調製したDNA断片をベクターに組み込んで組換え体DNAライブラリーを作製し、ついで、形質転換体を作製する。調製した形質転換体からコロニーハイブリダイゼーションにより、ニトリラーゼ遺伝子を含む形質転換体を選別し、サザンハイブリダイゼーションで確認する。

【0010】(4)塩基配列の決定

工程(3)で選別された形質転換体に含まれる組換え体DNA中のDNA断片の塩基配列を決定する。

【0011】(5)ニトリラーゼ遺伝子の発現

不要部分を制限酵素で除去したニトリラーゼ遺伝子を含むDNA断片を発現ベクターに組み込み、形質転換体を作製後これを培養し、培養菌体から調製したニトリラーゼによりニトリル類からカルボン酸類を生産する。

【0012】上記の工程で用いるベクターとしては、プラスミド pUC19、プラスミド pMK2等が挙げられ、また形質転換に用いるホストとしては、E. coli HB101、E. coli JM103、E. coli JM109等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0013】ニトリラーゼの基質となるニトリル化合物としては、特開平1-317394号公報記載の $\alpha$ アミノニトリル化合物およびその他のニトリル化合物を挙げることができる。例えば、 $\alpha$ -アミノニトリルには、2-アミノプロパンニトリル、2-アミノブタンニトリル、2-アミノ-3-メチルブタンニトリル、2-アミノ-4-メチルペンタンニトリル、2-アミノ-3-メチルペンタンニトリル、2-アミノ-3-ヒドロキシプロパンニトリル、2-アミノ-3-ヒドロキシブタンニトリル、2-アミノ-3-グアニジノペンタンニトリル、2-アミノ-3-メチルカプトプロパンニトリル、2,7-ジアミノ-4,5-ジチアオクタンニトリル、2-アミノ-4-メチルオキシブタンニトリル、2-アミノ-3-フェニルプロパンニトリル、3-(4-ヒドロキシフェニル)プロパンニトリル、3-アミノ-3-シアノプロパン酸、4-アミノ-4-シアノブタン酸、3-アミノ-3-シアノプロパンアミド、4-アミノ-4-シアノブタンアミド、2,6-ジアミノヘキサンニトリル、2,6-ジアミノ-5-ヒドロキシヘキサンニトリル、2-アミノ-3-(3-インドリル)プロパンニトリル、2-アミノ-3-(4-イミダゾイル)プロパンニトリル、2-シアノピロリジン、2-シアノ-4-ヒドロキシピロリジン、2-アミノ-2-フェニルエタンニトリルなどを例示することができる。また、他のニトリル化合物としては例えば、アセトニトリル、プロピオニトリル、n-ブチロニトリル、n-カプロニトリル、メタクリロニトリル、イソブチロニトリル、グルタロニトリル、トリアクリロニトリル、クロトノニトリル、ラクトニトリル、サクシノニトリル、アクリロニトリル、ベンゾニトリル、フェニルアセトニトリル等を例示することができ

る。しかし、これらのニトリル化合物に限定されるものではない。また、 $\alpha$ -ニトリル化合物は、DL体を用いてもよいし、L体あるいはD体を用いることができる。L体又はD体を用いると、光学活性をもつアミノ酸を簡単な操作で得ることができる。

【0014】ニトリル類のカルボン酸類への変換には上記酵素標品の他、形質転換体の培養液、菌体、菌体処理物、固定化菌体等を用いることができる。ニトリル類のカルボン酸への変換反応は、前記したニトリル化合物を酵素、菌体またはその処理物と接触させることによって行なわれるが、pH6~12、温度20~50℃の範囲で、種々の緩衝液で行なうことができる。緩衝液としては、燐酸緩衝液、アンモニア緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液等を用いることができ、前記緩衝液に必要に応じて、該菌体の生育を促す炭素源、窒素源その他の成分を添加して行なうことができる。これらの反応液条件の一例は、特開平1-317394号公報、或は特開平4-79894号公報に既に記載されている。炭素源、窒素源その他の成分を添加して行なうことができる。これらの反応条件の一例は、特開平1-317394号公報や特開平4-79894号公報にすでに記載されている。得られたカルボン酸は、相分離、濾過、抽出、カラムクロマトグラフィー等公知の手段を適用して分離、採取することができる。

【0015】以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明する。

#### 【実施例】

(1)ニトリラーゼのアミノ酸配列のN-末端の部分配列の決定とDNAプローブの作製

*Rhodococcus rhodochrous* PA-34 を培地(グルコース、10g;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、2.5g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、2.0g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.03g;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.06g; 酵母エキス、0.1g; イソブチルニトリル、5ml; 水、1 l; pH7.2)に加え、該菌体30℃で28時間培養した。その後、該培養液より該菌を遠心分離で集菌し、その菌体をジチオスライトール5mMを含む0.1M 燐酸緩衝液(以降、燐酸緩衝液は前記の組成を称する)で洗浄し、燐酸緩衝液に懸濁した。得られた懸濁液中の菌体の菌体をフレンチプレスで破碎し、付加荷重13000gで20分遠心分離し、得られた上清を素酵素液とした。文献(App 1. Microbiol. Biotechnol., 37, 184-190(1992))に記載する方法に従い、該素酵素液を硫酸分画した後、*Rhodococcus rhodochrous* PA-34 由来のニトリラーゼをSephacryl S-300 HR、DEAE Toyopearl650S カラムクロマトグラフィーにより分離精製した。単離された該ニトリラーゼを用い、アミノ酸シーケンサー(アプライドバイオシステム社製)によりそのN末端アミノ酸配列を解析した。決定されたN末端から11個のアミノ酸配列を配列表配列番号3に示す。次いで、このアミノ酸配列から予想される塩基配列を有する合成DNAを自動DNA合成機(ベックマン社製)で作製し、更に、該合成DNAの

5' 末端の1つの該酸をT4ポリヌクレオチドキナーゼと [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP とを用い放射性同位元素 $^{32}$ P でラベルしたDNAプローブを作製した。該DNAプローブの塩基配列、5' 末端の1つの塩基を除く32の塩基配列を配列表配列番号4に示す。なお、2種のコドンが予想される Glu、Tyr、Asn、Phe 及び Lys に付いては、それぞれ2種の塩基を、又4種のコドンが予想される Thr と Val に付いては、それぞれイノシン酸 (I) を含む1種の塩基を用いて、予測される複数種の合成DNAを作製した。以下の工程においては、前記の各塩基配列を有する合成DNAからなる混合物を、DNAプローブとして使用した。

【0016】(2) ニトリラーゼ遺伝子を含むDNA断片の調製

ロドコッカス ロドクロス (*Rhodococcus rhodochrous*) PA-34 (微工研条寄第1559号) を培地 (グルコース、10 g;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、2.5 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、2 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5 g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.03 g;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.06 g; 酵母エキス、0.1 g; イソブチロニトリル、5 ml; 水、1 l; pH7.2) 中30℃で24時間培養後、グリシンを0.2Mとなるように添加し24時間培養した。集菌後10mMのEDTAを含む10mMのTris-HCl緩衝液 (pH8) で洗浄し、吸光度単位で50となるよう10mMのEDTAを含む10mMのTris-HCl緩衝液 (pH8) に懸濁した。調製した菌懸濁液にリゾチームとアクロモバクターのエンドペプチダーゼをそれぞれ10mg/ml、5mg/mlとなるように加え、58℃で2時間放置後、SDS (Sodium dodecyl sulfate) を2%となるよう加え、58℃で2時間放置した。前記処理の後、この菌体を文献 (Biochim. Biophys. Acta, 72, 619-629 (1963)) に記載する方法に従って破碎して、該菌体中に含まれる遺伝子を取り出し、その遺伝子より当該菌由来のニトリラーゼ遺伝子を含むトータルDNAを調製した。調製したトータルDNAを各種の制限酵素で消化後、得られたDNA断片と配列表配列番号4に記す核酸配列を有する上記工程(1)で作製したDNAプローブとを用いて、文献 (Basic methods in molecular biology, Elsevier, New York (1986)) に記載する方法に従ってサザンハイブリダイゼーションを行った。2X SSC緩衝液中でのプレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションの温度は56℃とし、洗浄温度は50℃とした。オートラジオグラムの結果、EcoR I分解物の約0.9kbpの断片、BamH I分解物の約2.6kbpの断片、及びPst I分解物の約9.5kbpの断片、この3つのDNA断片が上記DNAプローブとハイブリダイズすることを確認した。前記3つのDNA断片は、配列表配列番号3に記す当該菌由来のニトリラーゼN末端から11個のアミノ酸配列をコードする核酸塩基配列を有することが分り、それをそれぞれ分取した。

【0017】(3) 組換え体DNAライブラリーの作製  
前記のEcoR I分解物の約0.9kbpの断片、BamH I分解物の約2.6kbpの断片、及びPst I分解物の約9.5kbpの断片、

即ち上記工程(2)で分取した3つのDNA断片を、それぞれ制限酵素EcoR I、BamH I、Pst Iで処理後、大腸菌アルカリフオスファターゼで処理したプラスミドベクターpUC19にリゲーションキット (宝酒造社製) で組み込んだ。この操作により、EcoR I分解物の約0.9kbpの断片、BamH I分解物の約2.6kbpの断片、及びPst I分解物の約9.5kbpの断片がそれぞれ組み込まれた組換え体プラスミドベクター、図1に示すpNLE、pNLB及びpNLPの3種の組換え体をそれぞれ調製した。これらの操作及び以下に記す組換え体プラスミドベクターを用いるDNAライブラリーを作製する操作は、文献 (Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor, New York (1989)) に従って行った。調製した組換え体プラスミドベクターで大腸菌 E. coli HB101 を形質転換し、その形質転換菌株をプレート上に生育して得られるアンピシリン耐性コロニーから、コロニーハイブリダイゼーションにより組換え体プラスミドベクターを持つコロニーのみを選別した。次いで、選別したコロニーから組換え体プラスミドベクターに含まれるDNAを抽出し、上記工程(2)に記載する方法で準じてサザンハイブリダイゼーションを行って、目的の組換え体DNA、即ち配列表配列番号3に記す当該菌 *Rhodococcus rhodochrous* PA-34 由来のニトリラーゼのN末端から11個のアミノ酸配列をコードする該酸塩基配列を有し、且つそれぞれEcoR I分解物の約0.9kbpの断片、BamH I分解物の約2.6kbpの断片、及びPst I分解物の約9.5kbpの断片であることを確認した。この操作により調製した組換え体DNAを用いて、各組換え体プラスミドベクターの制限酵素地図を調べ、pNLE、pNLB及びpNLPの3種の組換え体はそれぞれ図1の制限酵素地図を有することが分かった。プラスミドpNLEはEcoR I分解物の約0.9kbpの断片を含むプラスミド、プラスミドpNLBはBamH I分解物の約2.6kbpの断片を含むプラスミド、プラスミドpNLPはPst I分解物の約9.5kbpの断片を含むプラスミドであり、更には図1に示す制限酵素地図に従い、プラスミドpNLPに含まれるPst I分解物の約9.5kbpの断片を制限酵素EcoR I及びBamH Iで消化して得られる2種の断片は、それぞれプラスミドpNLEに含まれるEcoR I分解物の約0.9kbpの断片及びpNLBに含まれるBamH I分解物の約2.6kbpの断片と同じであることがハイブリダイゼーションにより分かった。前記操作により、3種の組換え体プラスミドpNLE、pNLB及びpNLPより得られる組換え体DNAライブラリーが作製された。

【0018】(4) 塩基配列の決定

工程(3)で得られた組換え体プラスミド中のDNA断片より、その核酸塩基配列の一部をディデオキシ法 (Proc. Natl. Acad. Sci., 74, 5463-5467 (1977)) により決定した。前記組換え体プラスミドpNLPより得られるPst I分解物の約9.5kbpの断片を制限酵素Hind IIIで切断して得られるDNA断片に、配列表配列番号5に示す塩基

配列が存在し、工程(1)で決定したアミノ酸配列から予測される核酸塩基配列が確認された。即ち、配列表配列番号5に示す塩基配列中に含まれる配列表配列番号2に示す核基配列部分が、配列表配列番号1に示すアミノ酸配列をコードすることが確認され、Rhodococcus rhodochrous PA-34 由来のニトリラーゼの遺伝子であることが分った。

#### 【0019】(5) ニトリラーゼ遺伝子の発現

プラスミドpNLP中の断片からニトリラーゼ遺伝子全体を含むHind III-Pst I断片(約4.7kbp)をサブクローニングし、得られた断片を制限酵素Bam HIで処理後、約2.2kbpの断片を制限酵素Sma Iで処理した発現ベクターpMK2

(特開昭64-51088号公報)に組み込み、プラスミドpNLP2と命名した。図6にプラスミドpNLP2の制限酵素地図とニトリラーゼ遺伝子の所在位置を示した。次いで大腸菌E. coli HB 101 及びE. coli JM 109 を形質転換し、それぞれからアンピシリン耐性を示すコロニーを取得した。取得したコロニーを2xYT培地で30℃で一晩培養後集菌し、5mM のディチオスライトールを含む0.1M磷酸緩衝液で2回洗浄後、同じ緩衝液に懸濁した。文献( Appl. Microbiol. Biotechnol., 37, 184-190(1992) )記載の方法に従い、得られた菌懸濁液1ml に75mMの $\alpha$ -アミノイソカプロニトリルを加え、30℃で1時間反応させて、基質 $\alpha$ -アミノイソカプロニトリルより生成されるL-ロイシンの量を計量することで、各コロニーより得た休止菌体のニトリラーゼ活性を測定し、E. coli HB 101 及びE. coli JM 109 の形質転換株から1株ずつ最も高いニトリラーゼ活性を示すコロニーの各1株ずつを選定した。この選別された微生物は、通産省工業技術院生命工学工業技術研究所にブタペスト条約に基づき、E. coli HB 101 の形質転換株 E. coli HB 101 (pNLP2) はFERM BP-4404\*

E. coli HB 101組換え体及び E. coli JM 109組換え体によるニトリラーゼ生産

菌株	蛋白質 (mg/l)	Units	比活性	
HB 101 (pNLP2)	3266	19.6	0.006	
JM 109 (pNLP2)	949	7.6	0.008	
PA-34	994	242.5	68.9	参考例

1 unitは $\alpha$ -アミノイソカプロニトリルから1分間に1  $\mu$ mol のロイシンが生産されることを示す。

#### 【0022】

【発明の効果】本発明により $\alpha$ -アミノニトリルからアミノ酸を生産するニトリラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列、及び該DNA配列を有する発現ベクターで形質転換された微生物が該ポリペプチドを生産すること、また生産された該ポリペプチドが $\alpha$ -アミノニトリルからアミノ酸を製造することが明らかに※

#### 配列

1	5	10	15
Met Val Glu Tyr Thr Asn Thr Phe Lys Val Ala Ala Val Gln Ala			
20	25	30	

\*号として、またE. coli JM 109の形質転換株 E. coli JM 109 (pNLP2)はFERM BP-4405号として寄託されている。

【0020】次いで、これらの2種の菌株それぞれをコロニーを100ml のイソプロピル - $\beta$ -D- チオガラクトピラノシド(ITPG)をtac インデューサーとして加えた2xYT培地で30℃で一晩培養後集菌し、5mM のディチオスライトールを含む0.1M磷酸緩衝液で2回洗浄後、同じ緩衝液に懸濁した。菌懸濁液をフレンチプレスで処理して粗酵素液とし、文献( Appl. Microbiol. Biotechnol., 37, 184-190(1992) )記載の方法で $\alpha$ -アミノイソカプロニトリルを基質として休止菌体のニトリラーゼ活性を測定した。結果を表1に示した。表1には参考例としてロドコッカス ロドクロス(Rhodococcus rhodochrous) PA-34の粗酵素抽出液を用いた結果も示した。表1より、該2種の形質転換株は、それぞれ Rhodococcus rhodochrous PA-34 由来のニトリラーゼを休止菌体内に産生しており、本来宿主菌株は有していないニトリラーゼ活性を示すことが判る。更には、該2種の形質転換株に内在せしめた組換え体DNAより、目的とする Rhodococcus rhodochrous PA-34 由来のニトリラーゼのポリペプチドが産生されていることが分かる。なお、このポリペプチドの有する酵素活性により生産される、 $\alpha$ -アミノニトリルより対応する $\alpha$ -アミノ酸は、文献( Appl. Microbiol. Biotechnol., 37, 184-190(1992) )に記載する Rhodococcus rhodochrous PA-34 由来のニトリラーゼと同様に、光学活性体の一つのみが生産されるものである。即ち、光学純度の高い $\alpha$ -アミノ酸が生産されるものである。

#### 【0021】

#### 【表1】

E. coli HB 101組換え体及び E. coli JM 109組換え体によるニトリラーゼ生産

菌株	蛋白質 (mg/l)	Units	比活性	
HB 101 (pNLP2)	3266	19.6	0.006	
JM 109 (pNLP2)	949	7.6	0.008	
PA-34	994	242.5	68.9	参考例

※された。

#### 【0023】

#### 【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 380

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

9		10
Gln Pro Val Trp Phe Asp Ala Ala Lys Thr Val Asp Lys Thr Val		
35	40	45
Ser Ile Ile Ala Glu Ala Ala Arg Asn Gly Cys Glu Leu Val Ala		
50	55	60
Phe Pro Glu Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr His Ile Trp Val		
65	70	75
Asp Ser Pro Leu Ala Gly Met Ala Lys Phe Ala Val Arg Tyr His		
80	85	90
Glu Asn Ser Leu Thr Met Asp Ser Pro His Val Gln Arg Leu Leu		
95	100	105
Asp Ala Ala Arg Asp His Asn Ile Ala Val Val Val Gly Ile Ser		
110	115	120
Glu Arg Asp Gly Gly Ser Leu Tyr Met Thr Gln Leu Ile Ile Asp		
125	130	135
Ala Asp Gly Gln Leu Val Ala Arg Arg Arg Lys Leu Lys Pro Thr		
140	145	150
His Val Glu Arg Ser Val Tyr Gly Glu Gly Asn Gly Ser Asp Ile		
155	160	165
Ser Val Tyr Asp Met Pro Phe Ala Arg Leu Gly Ala Leu Asn Cys		
170	175	180
Trp Glu His Phe Gln Thr Leu Thr Lys Tyr Ala Met Tyr Ser Met		
185	190	195
His Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Gly Met Ser Leu Tyr		
200	205	210
Gln Pro Glu Val Pro Ala Phe Gly Val Asp Ala Gln Leu Thr Ala		
215	220	225
Thr Arg Met Tyr Ala Leu Glu Gly Gln Thr Phe Val Val Cys Thr		
230	235	240
Thr Gln Val Val Thr Pro Glu Ala His Glu Phe Phe Cys Glu Asn		
245	250	255
Glu Glu Gln Arg Lys Leu Ile Gly Arg Gly Gly Gly Phe Ala Arg		
260	265	270
Ile Ile Gly Pro Asp Gly Arg Asp Leu Ala Thr Pro Leu Ala Glu		
275	280	285
Asp Glu Glu Gly Ile Leu Tyr Ala Asp Ile Asp Leu Ser Ala Ile		
290	295	300
Thr Leu Ala Lys Gln Ala Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg		
305	310	315
Pro Asp Val Leu Ser Leu Asn Phe Asn Gln Arg Arg Thr Thr Pro		
320	325	330
Val Asn Thr Pro Leu Ser Thr Ile His Ala Thr His Thr Phe Val		
335	340	345
Pro Gln Phe Gly Ala Leu Asp Gly Val Arg Glu Leu Asn Gly Ala		
350	355	360
Asp Glu Gln Arg Ala Leu Pro Ser Thr His Ser Asp Glu Thr Asp		
365	370	375
Arg Ala Thr Ala Pro Ser Asp Ser Gly Ala Pro Val Ala Pro Pro		
380		
Lys Arg His Gly Val	50	

【0024】配列番号：2

配列の長さ：1130

配列の型：核酸

配列

ATG GTC GAA TAC ACA AAC ACA TTC AAA GTT GCT GCG GTG CAG GCA 45  
 CAG CCT GTG TGG TTC GAC GCG GCC AAA ACG GTC GAC AAG ACC GTG 90  
 TCC ATC ATC GCG GAA GCA GCC CGG AAC GGG TGC GAG CTC GTT GCG 135  
 TTT CCC GAG GTA TTC ATC CCG GGG TAC CCG TAC CAC ATC TGG GTC 180  
 GAC AGC CCG CTC GCC GGA ATG GCG AAG TTC GCC GTG CGC TAC CAC 225  
 GAG AAT TCC CTG ACG ATG GAC AGC CCG CAC GTA CAG CGG TTG CTC 270  
 GAT GCC GCC CGC GAC CAC AAC ATC GCC GTA GTG GTG GGA ATC AGC 315  
 GAG CGG GAT GGC GGC AGC TTG TAC ATG ACC CAG CTC ATC ATC GAC 360  
 GCC GAT GGG CAA CTG GTC GCC CGA CGC CGC AAG CTC AAG CCC ACC 405  
 CAC GTC GAG CGT TCG GTA TAC GGA GAA GGA AAC GGC TCG GAT ATC 450  
 TCC GTG TAC GAC ATG CCT TTC GCA CGG CTT GGC GCG CTC AAC TGC 495  
 TGG GAG CAT TTC CAG ACG CTC ACC AAG TAC GCA ATG TAC TCG ATG 540  
 CAC GAG CAG GTG CAC GTC GCG AGC TGG CCT GGC ATG TCG CTG TAC 585  
 CAG CCG GAG GTC CCC GCA TTC GGT GTC GAT GCC CAG CTC ACG GCC 630  
 ACG CGT ATG TAC GCA CTC GAG GGA CAA ACC TTC GTG GTC TGC ACC 675  
 ACC CAG GTG GTC ACA CCG GAG GCC CAC GAG TTC TTC TGC GAG AAC 720  
 GAG GAA CAG CGA AAG TTG ATC GGC CGA GGC GGA GGT TTC GCG CGC 765  
 ATC ATC GGG CCC GAC GGC CGC GAT CTC GCA ACT CCT CTC GCC GAA 810  
 GAT GAG GAG GGG ATC CTC TAC GCC GAC ATC GAT CTG TCT GCG ATC 855  
 ACC TTG GCG AAG CAG GCC GCT GAC CCC GTG GGC CAC TAC TCA CGG 900  
 CCG GAT GTG CTG TCG CTG AAC TTC AAC CAG CGC CGC ACC ACG CCC 945  
 GTC AAC ACC CCA CTT TCC ACC ATC CAT GCC ACG CAC ACG TTC GTG 990  
 CCG CAG TTC GGG GCA CTC GAC GGC GTC CGT GAG CTC AAC GGA GCG 1035  
 GAC GAA CAG CGC GCA TTG CCC TCC ACA CAT TCC GAC GAG ACG GAC 1080  
 CGG GCG ACA GCA CCC TCT GAC TCG GGC GCA CCC GTG GCG CCT CCG 1125  
 AAG CGC CAC GGT GTG

\* 鎖の数：二本鎖

トポロシー：直鎖状

\* 配列の種類：他の核酸

【0025】配列番号：3

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロシー：直鎖状

配列の種類：ペプチド配列

Met Val Glu Tyr Thr Asn Thr Phe Lys Val Ala

1

5

10

【0026】配列番号：4

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロシー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TAC CAI CTT ATG TGI TTG TGI AAG TTT CAI CG  
 C A A A C

【0027】配列番号：5

配列

CAC GGG TGG CGC AGA ATG CCA GGA CCC GTG TCA TTC CAC GTC AAT 45  
 TCA CGC GCC TTT TCA CCT CGT ACT GTC CTG CCA AAC ACA AGC AAC 90

※配列の長さ：1341

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロシー：直鎖状

配列の種類：Senomic DNA

起源

生物名：ロドコッカス ロドクロス (*Rhodococcus rhodochrous*)

株名：PA-34

40

※



13

14

GGA GGT ACG GAC ATG GTC GAA TAC ACA AAC ACA TTC AAA GTT GCT 135  
     Met Val Glu Tyr Thr Asn Thr Phe Lys Val Ala  
 GCG GTG CAG GCA CAG CCT GTG TGG TTC GAC GCG GCC AAA ACG GTC 180  
 Ala Val Gln Ala Gln Pro Val Trp Phe Asp Ala Ala Lys Thr Val  
 GAC AAG ACC GTG TCC ATC ATC GCG GAA GCA GCC CGG AAC GGG TGC 225  
 Asp Lys Thr Val Ser Ile Ile Ala Glu Ala Ala Arg Asn Gly Cys  
 GAG CTC GTT GCG TTT CCC GAG GTA TTC ATC CCG GGG TAC CCG TAC 270  
 Glu Leu Val Ala Phe Pro Glu Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr  
 CAC ATC TGG GTC GAC AGC CCG CTC GCC GGA ATG GCG AAG TTC GCC 315  
 His Ile Trp Val Asp Ser Pro Leu Ala Gly Met Ala Lys Phe Ala  
  
 GTG CGC TAC CAC GAG AAT TCC CTG ACG ATG GAC AGC CCG CAC GTA 360  
 Val Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Thr Met Asp Ser Pro His Val  
 CAG CGG TTG CTC GAT GCC GCC CGC GAC CAC AAC ATC GCC GTA GTG 405  
 Gln Arg Leu Leu Asp Ala Ala Arg Asp His Asn Ile Ala Val Val  
 GTG GGA ATC AGC GAG CGG GAT GGC GGC AGC TTG TAC ATG ACC CAG 450  
 Val Gly Ile Ser Glu Arg Asp Gly Gly Ser Leu Tyr Met Thr Gln  
 CTC ATC ATC GAC GCC GAT GGG CAA CTG GTC GCC CGA CGC CGC AAG 495  
 Leu Ile Ile Asp Ala Asp Gly Gln Leu Val Ala Arg Arg Arg Lys  
 CTC AAG CCC ACC CAC GTC GAG CGT TCG GTA TAC GGA GAA GGA AAC 540  
 Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Ser Val Tyr Gly Glu Gly Asn  
 GGC TCG GAT ATC TCC GTG TAC GAC ATG CCT TTC GCA CGG CTT GGC 585  
 Gly Ser Asp Ile Ser Val Tyr Asp Met Pro Phe Ala Arg Leu Gly  
 GCG CTC AAC TGC TGG GAG CAT TTC CAG ACG CTC ACC AAG TAC GCA 630  
 Ala Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Thr Leu Thr Lys Tyr Ala  
 ATG TAC TCG ATG CAC GAG CAG GTG CAC GTC GCG AGC TGG CCT GGC 675  
 Met Tyr Ser Met His Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Gly  
 ATG TCG CTG TAC CAG CCG GAG GTC CCC GCA TTC GGT GTC GAT GCC 720  
 Met Ser Leu Tyr Gln Pro Glu Val Pro Ala Phe Gly Val Asp Ala  
 CAG CTC ACG GCC ACG CGT ATG TAC GCA CTC GAG GGA CAA ACC TTC 765  
 Gln Leu Thr Ala Thr Arg Met Tyr Ala Leu Glu Gly Gln Thr Phe  
 GTG GTC TGC ACC ACC CAG GTG GTC ACA CCG GAG GCC CAC GAG TTC 810  
 Val Val Cys Thr Thr Gln Val Val Thr Pro Glu Ala His Glu Phe  
 TTC TGC GAG AAC GAG GAA CAG CGA AAG TTG ATC GGC CGA GGC GGA 855  
 Phe Cys Glu Asn Glu Glu Gln Arg Lys Leu Ile Gly Arg Gly Gly  
 GGT TTC GCG CGC ATC ATC GGG CCC GAC GGC CGC GAT CTC GCA ACT 900  
 Gly Phe Ala Arg Ile Ile Gly Pro Asp Gly Arg Asp Leu Ala Thr  
 CCT CTC GCC GAA GAT GAG GAG GGG ATC CTC TAC GCC GAC ATC GAT 945  
 Pro Leu Ala Glu Asp Glu Glu Gly Ile Leu Tyr Ala Asp Ile Asp  
 CTG TCT GCG ATC ACC TTG GCG AAG CAG GCC GCT GAC CCC GTG GGC 990  
 Leu Ser Ala Ile Thr Leu Ala Lys Gln Ala Ala Asp Pro Val Gly  
 CAC TAC TCA CGG CCG GAT GTG CTG TCG CTG AAC TTC AAC CAG CGC 1035  
 His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser Leu Asn Phe Asn Gln Arg  
 CGC ACC ACG CCC GTC AAC ACC CCA CTT TCC ACC ATC CAT GCC ACG 1080  
 Arg Thr Thr Pro Val Asn Thr Pro Leu Ser Thr Ile His Ala Thr  
 CAC ACG TTC GTG CCG CAG TTC GGG GCA CTC GAC GGC GTC CGT GAG 1125  
 His Thr Phe Val Pro Gln Phe Gly Ala Leu Asp Gly Val Arg Glu  
 CTC AAC GGA GCG GAC GAA CAG CGC GCA TTG CCC TCC ACA CAT TCC 1170  
 Leu Asn Gly Ala Asp Glu Gln Arg Ala Leu Pro Ser Thr His Ser  
 GAC GAG ACG GAC CGG GCG ACA GCA CCC TCT GAC TCG GGC GCA CCC 1215

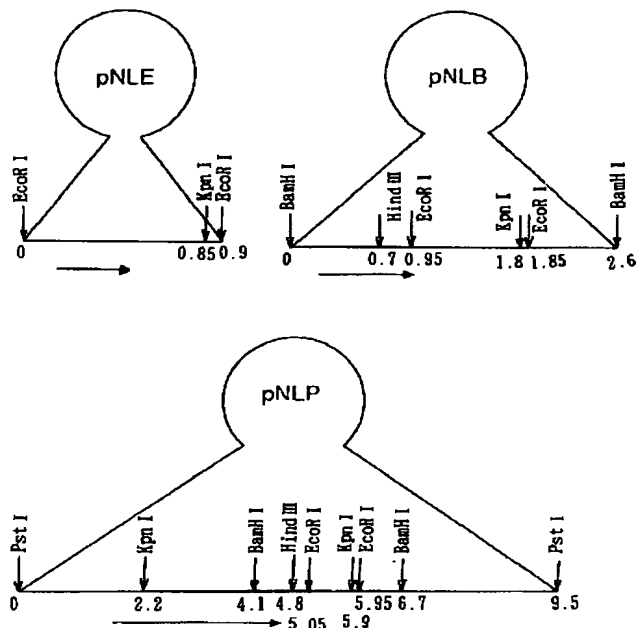
Asp Glu Thr Asp Arg Ala Thr Ala Pro Ser Asp Ser Gly Ala Pro  
 GTG GCG CCT CCG AAG CGC CAC GGT GTG TGA AGG GGC GAG ACA GGG 1260  
 Val Ala Pro Pro Lys Arg His Gly Val \*  
 GAA TCG GAG GAT CAC CGA GTA CAC CAT CGT CGA TCG CAG CGA GTA 1305  
 GCC CGC CCG TAC CCC GAT AGG TCC ACC CCA CGT ATC

【図面の簡単な説明】

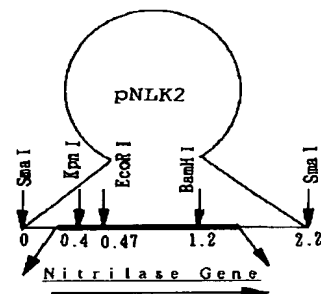
【図 1】 実施例によって得られた 3 種類の組換え体プラスミド pNLE、pNLB、pNLP の制限酵素地図を示す。 \*

\* 【図 2】 実施例で得られた発現プラスミド pNLK2 の制限酵素地図を示す。

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 P 13/04

2121-4B

/(C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 R 1:01)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 P 13/04

C 1 2 R 1:19)

C 1 2 R 1:01)